

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720061152265

UDC _____

厦门大学

_____硕士____学位论文

玻璃-PDMS 微流控抗体检测芯片的初步研究

Preliminary Study of Antibody Detection by Glass-PDMS

Microfluidic Chip

张 娜

指导教师姓名: 彭兴跃 副教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2009 年 10 月

论文答辩时间: 2009 年 12 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009年 12 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要.....	1
Abstract.....	3
第一章 前言	5
1.1 微流控芯片的发展简史	5
1.2 微流控芯片的基本概念	6
1.3 微流控芯片的材料与特点	7
1.4 微流控芯片的制作技术	8
1.5 微流控芯片的免疫分析	14
1.6 HIV 检测技术研究进展	16
1.7 本项目研究的主要内容和意义	19
第二章 材料与方法	21
2.1 主要仪器	21
2.2 主要试剂	21
2.3 基本溶液的配制	21
2.4 玻璃-PDMS 微流控芯片的制作	22
2.5 芯片上的人 IgG 检测	23
2.6 间接荧光免疫法检测 HIV 抗体	25
2.7 图象处理	25
第三章 结果和分析	26
3.1 微流控芯片的制作	26
3.2 芯片上蛋白免疫反应扫描图	27
3.3 芯片上的荧光免疫杂交初步分析	28
3.4 吸液间隔不同的孵育时间	38
3.5 封闭液的选择	40
3.6 芯片上的人 IgG 检测结果分析	41
3.7 芯片上人 IgG 的最低浓度检测	52
3.8 间接荧光免疫法检测 HIV 抗体	53

第四章 讨论	57
4.1 微流控芯片的制作	57
4.2 芯片上的人 IgG 检测	59
4.3 ELISA 和芯片检测 IgG 的比较	61
4.4 间接免疫荧光法 (IFA) 检测 HIV 抗体	62
第五章 小结和展望	64
5.1 小结	64
5.2 展望	64
参考文献	65
致谢	70
附录：研究生期间发表的论文	71

Content

Chinese abstract	1
English abstract	3
1. Introduction	5
1.1 Brief history of microfluidic chip	5
1.2 Basic concepts of microfluidic chip	6
1.3 Materials and peculiarity of microfluidic chip	7
1.4 Fabrication technology of microfluidic chip	8
1.5 Immunoassay of microfluidic chip	14
1.6 Progress in research of HIV detection technology	16
1.7 Purpose of this project	19
2. Materials and Methods	21
2.1 Instrument	21
2.2 Reagents	21
2.3 Preparation of solutions	21
2.4 Fabrication of microfluidic chip	22
2.5 Detection of human IgG on microfluidic chip	23
2.6 Detection of HIV antibody by indirect immunofluorescence assay	25
2.7 Image processing	25
3. Results and Analysis	26
3.1 Fabrication of microfluidic chip	26
3.2 Scanned image of human IgG immunoreaction on microfluidic chip	27
3.3 Preliminary study on human IgG immunoreaction on microfluidic chip	28
3.4 Different time of incubation between imbibitions	38
3.5 Choice of blocking buffer	40
3.6 Detection of human IgG on microfluidic chip	41
3.7 Lowest detection concentration of human IgG on microfluidic chip	52

3.8 Detection of HIV antibody by indirect immunofluorescence assay.....	53
4. Discussion.....	57
4.1 Fabrication of microfluidic chip.....	57
4.2 Detection of human IgG on a chip	59
4.3 Comparative detection between ELISA and microfluidic chip.....	61
4.4 Detection of HIV antibody by indirect immunofluorescence assay.....	62
5. Conclusion and Expection	64
5.1 Conclusion	64
5.2 Expection	64
6. References	65
7. Acknowledgements	70
8. Publications.....	71

摘要

微流控芯片利用微加工技术在芯片上制作各种功能单元构成微型化学系统，并在该系统中完成样品的前处理、化学反应、分离、检测等功能。微流控芯片分析系统因其微型化、集成化、高效、低耗等优点，在生物医学、高通量药物合成筛选、环境检测与保护等众多领域具有巨大的应用潜力。

抗体是机体产生特异性免疫效应的免疫球蛋白，其中IgG是血清学诊断和疫苗免疫后检测的主要效应蛋白质，血清免疫球蛋白的含量对于某些疾病的诊断和治疗具有指导意义。本文主要研究了玻璃-聚二甲基硅氧烷（Poly(dimethylsiloxane)，PDMS）微流控芯片上人IgG的免疫反应条件。

本文首先研究玻璃-PDMS芯片的制作。其工艺流程包括掩模的制作、光刻、湿法腐蚀、PDMS的制作。在实验中优化了影响最终图形分辨率和高深宽度比的主要工艺条件如曝光时间、显影时间、腐蚀时间和温度等。

在此芯片上以人IgG为对象确定免疫反应最佳的优化条件。直接固定Cy3标记的人IgG样品，可评价蛋白质在氨基玻片表面的固定效率。通过荧光标记抗人IgG与玻片上固定的人IgG的反应，可评价已固定蛋白质的反应活性。实验主要结果如下：

(1)通过玻片上固定不同浓度人IgG，经过洗涤、封闭，再加入相同浓度Cy3标记的羊抗人IgG与之杂交，检测各点的荧光强度，确定了人IgG固定的饱和浓度为1mg/mL。

(2)采用0.04 mg/mL的Cy3标记的羊抗人IgG，人IgG与荧光二抗有最大的结合力。

(3)不同吸液次数的0.005 mg/mL的人IgG与饱和浓度的Cy3标记的羊抗人IgG反应得出0.005 mg/mL的人IgG最大吸液次数为7次。

(4)玻片上饱和浓度的人IgG与不同吸液次数的0.0004 mg/mL的Cy3标记的羊抗人IgG反应得出0.0004 mg/mL的荧光二抗的最大吸液次数为6次。

(5)将本方法与酶联免疫吸附实验（Enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）进行了比较，结果表明本方法灵敏度更高。人IgG的最低检测浓度为5ng/mL。

(6)以芯片上人IgG的条件优化初步研究了HIV抗体的间接荧光免疫法

(indirect immunofluorescence assay, IFA) 检测。

总的来说，与传统的ELISA方法相比，芯片上的荧光标记法灵敏度更高，而且成本低、信号稳定、操作简便，是很有前景的检测方法。

关键词：微流控芯片；蛋白芯片；人IgG

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Microfluidic chip is an integrating variously functional unit through microfabrication. on which sample pretreatment, chemical reaction, separation, detection and other operations are completed. Microfluidic chip has many advantages: miniaturization, integration, high performance and low cost. So it has great potential in biomedicines, medicine synthesizing and screening, environment protection and monitoring.

Antibody is a immunoglobulin which is a specific immune response to the airframe, and IgG is the main protein to the detection of serological diagnosis and vaccine immunity. The concent of serum immune globulin plays an important guiding role in certain diseases diagnosis and treatment. In this paper, attention is paid to the development of a glass-PDMS microfluidic chip and evaluation on the model of human IgG.

A method has been established to prepare glass-PDMS microfluidic chip in this paper. The fabrication process includes preparation of mask, exposure of photoresist, development of patten, wet etching and preparation of the base PDMS. We determine the optimum conditions affecting the depth breadth ratio and exactitude such as the time of exposure and development of patten, the temperature and the time of wet etching, *et al.*

To determine the optimum conditions of immune reaction on glass-PDMS microfluidic chip, we put IgG to the on-chip tests. Cy3 labeled goat anti-human IgG is directly immobilized on microfluidic chip, to estimate immobilization efficiency of protein. The anti-human IgG is hybridized with human IgG immobilized on the glass to evaluate the activity of immobilized protein. The main results are shown as follows:

(1)A series of diluted human IgG are immobilized on the surface of the glass. The Cy3 labeled second antibody is added on. After incubation and washing, the microchips are scanned with fluorescence microscope. The maximum concentration is effective for the immobilization of IgG is then determined 1mg/mL.

(2)The optimal dilution of Cy3 labeled goat anti-human IgG is 0.04 mg/mL, human IgG has a maximum combination with Cy3 labeled goat anti-human IgG.

(3)0.005 mg/mL human IgG are respectively applied on the same channel with saturated concentration of Cy3 labeled goat anti-human IgG, Results show the maximum channel suck times is seven times.

(4)Saturated concentration of human IgG respectively reacted with 0.004 mg/mL Cy3 labeled goat anti-human IgG. The experiment result suggests the maximum channel suck times is six times.

(5)Compared this method with traditional ELISA, the chip method exhibits higher sensitivity. Moreover, the detection limit of human IgG is at the level of 5ng/mL.

(6)The on-chip HIV antibody detection according to the optimum conditions has been tested. Results show HIV antibody can be detected by indirect immunofluorescence assay.

Compared with traditional ELISA method, this on-chip Cy3 fluorescence detection method is more versatile and more sensitive of lower cost and has more stable signal. The prospect for this on-chip Cy3 fluorescence is great.

Key word: microfluidic chip; protein chip; human IgG

第一章 前言

1.1 微流控芯片的发展简史

早期发展阶段（1975-1989）：1975年，Terry 等人在一块硅片上加工出了一种芯片型的气相色谱分析器，它由一个注液阀门和一个 1.5 米长的分离柱组成，能在几秒钟内对混合物进行分离。虽然这个器件具有尺寸小，分离快速的突出特点，但是由于当时分离技术相对落后以及缺乏对类似器件的操作经验，整个科学界对这项划时代的工作响应寥寥。这段时间较受关注的研究领域是对微泵、微阀以及化学传感器的微加工，而将微泵、微阀、化学传感器与其他结构（如微流道）进行集成研究的报道相对较少。

复兴期（1990-1993）：微全分析系统的概念是在1990年首次由瑞士Ciba-Geigy公司的Manz与Widmer提出^[1]，当时主要强调了分析系统的“微”与“全”，及微管道网络的MEMES加工方法，而并未明确其外型特征。次年Manz等即在平板微芯片上实现了毛细管电泳与流动注射分析，从而把微系统的主要构型定位为一般厚度不超过5毫米，面积为数平方厘米至十几平方厘米的平板芯片^[2]。但直到1994年之前这一新领域的发展前景并不十分明朗。

快速发展期（1994-1997）：1994年始，美国橡树岭国家实验室Ramsey等^[3]在Manz的工作基础上发表了一系列论文，改进了芯片毛细管电泳的进样方法，提高了其性能与实用性，引起了更广泛的关注。在此形势下，该年首届 μ TAS会议以工作室的形式在荷兰Enschede举行，起到了推广微全分析系统的作用。1995年美国加州大学Berkeley分校的Mathies等人^[4]在微流控芯片上实现了高速DNA测序，微流控芯片的商业开发价值开始显现，而此时微阵列型的生物芯片已进入实质性的商品开发阶段。同年9月，首家微流控芯片企业，Caliper Technologies公司在美成立，虽然只有三十多名雇员，但一年即集资近千万美元。1996年Mathies等^[5]又将基因分析中有重要意义的聚合酶链反应(PCR)扩增与毛细管电泳集成在一起，展示了微全分析系统在试样处理方面的潜力，次年他们又实现了微流控芯片上的多通道毛细管电泳DNA测序，从而为微流控芯片在基因分析中的实际应用提供了重要基础。与此同时，有关企业中的微流控芯片研究开发工作也在加紧进行。

深入研究阶段（1998-目前）：1998年之后专利之战日益激烈，一些微流控

芯片开发企业纷纷与世界著名分析仪器生产厂家合作,利用各自的优势技术平台抢先推出首台微流控分析仪器。1999年9月惠普(现Agilent)与Caliper联合研制的首台微流控芯片商品化仪器开始在欧美市场销售,至2000年8月已可提供用于核酸及蛋白质分析的5-6种芯片。其它几家厂商也于今年开始将其产品推向市场。2000年5月第四届国际 μ -TAS会议的召开是对微全分析系统发展的一次全面检阅,它预示着微全分析系统的一个更大的发展高潮即将到来。

1.2 微流控芯片的基本概念

微流控既是一种科学也是一种技术,是使用微米级的通道对微量液体或样品进行处理或控制的系统^[6],是在微电子、微机械、生物工程和纳米技术基础上发展起来的一门全新的交叉学科。微流控芯片可以把样品的制备、反应、分离和检测等操作集成到芯片上,由微通道网络来调控反应过程。

微流控芯片具有广泛的应用前景,表1.1对它的应用领域和实际的应用情况进行了总结。纯粹从科学的角度看,微流控检测系统是很有意义的,首先因为它的微米级结构显著增大了流体环境的面积/比例体积,从而提高了分析性能。例如在微观进行的操作比在受扩散限制的宏观系统更有效,因为较短的距离更有利于物质的传输。另外,微流控检测系统还有许多潜在的优点。例如,可以使用许多不同的检测方法,样品准备同时在一芯片完成,真正的分析时间少。微型化其他重要的因素是试样和试剂消耗较少,即时分析,更严格地使用化学药品。我们还必须考虑到,器件尺寸的减小虽然提高了分析分辨率,却增大了检测难度,增大了堵塞的可能性,表面更容易产生吸附现象。

表1.1 微流控芯片的应用

Table1.1 The application of microfluidic chip

微流控芯片的应用领域	实际应用
基因、蛋白质研究	快速高通量测序、DNA指纹识别、法医学应用、基因表达分析等
化学、生物防御战	病原体、毒素的检测和确、早期诊断、治疗类选法
临床分析	对血液和体液进行快速分析、根据免疫、酶分析的结果进行及时诊断、电化学检测、细胞技术等
高通量药物筛选	药物的并行反应和分析、毒理分析等
环境检测	原位环境污染分析
植入式器件	用于活体药物输送、以及活体疾病状况监测等
作为化学或生物化学研究的实验工具（如微量有机合成、样品制备、核酸序列放大等）	并行反应、分析用生物样品的纯化、PCR， RT-PCR 反应等
作为进行基础研究的平台(如研究流体特性、研究化学反应进程、仿生研究或研究微量样品等	研究微流道内电渗和拉曼流特性、研究酶底物的扩散特性、开发具有生物功能的器件、单分子检测等

1.3 微流控芯片的材料与特点

小型化和微型化的微流控芯片一般仅有几平方厘米大小，厚度不超过几个毫米，因而分析芯片的材料^[7]一般采用刚性材料和弹性材料。刚性材料有单晶硅、无定性硅、玻璃、石英以及刚性的有机聚合物材料如环氧、聚脲、聚氨、聚苯乙烯和聚甲基丙烯酸甲酯等；弹性材料有聚二甲基硅氧烷（Poly(dimethylsiloxane), PDMS）等。表 1.2 列出了各种芯片材料的优缺点。

表 1.2 芯片材料的优缺点
Table1.2 Advantages and shortcomings of chip materials

材料种类	优点	缺点
单晶硅	具有化学惰性和热稳定性	易碎，价格贵
	加工工艺成熟，可使用光刻和蚀刻	不能透过紫外线
	等制备集成电路	电绝缘性能不够好
	成熟工艺进行加工和批量生产	表面化学行为较复杂
玻璃和石英	很好的电渗性质	难以得到深宽比大的通道
	优良的光学性质	加工成本高
	可用化学方法进行表面改性	键合难度较大
	光刻和蚀刻技术进行加工	
有机聚合物	成本低，品种多	不耐高温
	能通过可见与紫外光	导热系数低
	可用化学方法进行表面改性	表面改性的方法待进一步研究
	易于加工，可通过铸造成型，激光	
	溅射等方法得到深宽比大的通道	
PDMS ^[7]	可廉价大量地生产	
	能重复可逆变形不发生永久性破坏，用模塑法高保真地	不耐高温，导热系数低
	制备微流控芯片，能透过	表面改性的方法待进一步研究
	300nm 以上的紫外可见光，耐用且化学惰性，无毒价廉	

1.4 微流控芯片的制作技术

1.4.1 玻璃微流控芯片的制作

玻璃微流控芯片的制作过程如图1.1所示。首先在玻璃底片的表面上喷涂上一层将被腐蚀的牺牲层，常用的牺牲层是Cr/Au结构^[8-9]，Cr薄膜层(厚度通常为100-500Å)的作用是加强底板和金层之间的粘合，它是真正的牺牲层。也有报道

利用ITO导电玻璃为基材，直接利用ITO导电层（铟锡氧化物）作为牺牲层^[10]。另外可以利用光刻胶作为加工较浅通道的掩膜，在这种情形下，光敏材料起这两个作用，一个是作为牺牲层，另一个作用是用来传递掩膜的结构模式^[4]。

其次，光胶作为光刻技术中将掩膜上的微结构精确转移到基片的关键媒介。，根据用途不同，有多种黏度、光学性质及物理化学特征不同的品种。光胶有两种基本类型，一种在曝光时发生交联反应形成难溶的聚合物（负型），另一种在曝光时聚合物发生链断裂分解而变得更容易溶解（正型）。因此，负光胶曝光部分显影后被固定而非曝光部分被洗掉，而正光胶的曝光部分则在显影后被洗掉，非曝光部分被固定。

当掩膜上的微结构转移到微芯片，并且此时微芯片上的这些位置的牺牲层已去掉了，接下来的过程就是化学腐蚀了。化学刻蚀分两种，一种为湿法刻蚀，即使用适当的刻蚀剂，对未被胶层覆盖的玻璃表层进行腐蚀。它通过化学刻蚀液与被刻蚀物质之间的化学反应，将被刻蚀物质剥离下来。玻璃湿法刻蚀属于各向同性刻蚀，最大问题是在刻蚀图形时容易产生塌边现象，即在纵向刻蚀的同时，也出现侧向钻蚀，以致刻蚀图形的最小线宽受到限制。此外，根据不同需要调配刻蚀剂成分，刻蚀温度、搅拌速度等参数也随不同的管道尺寸及刻蚀深度要求而具体设置^[11]。另一种为干法刻蚀，干法刻蚀不涉及溶液反应过程，刻蚀在气相进行，主要有等离子体刻蚀和深度反应离子刻蚀两种方式。

微通道腐蚀成型后，可除去牺牲层。再进行超声打孔。储液池的边界质量直接影响了微流控芯片的键合和质量（直接影响边界质量的因素是钻孔速度，而钻孔速度受超声钻孔仪的电流强度影响）电流强度越大，钻孔速度越快，但是越容易在钻孔的初始和结束阶段造成边界的塌陷。尤其是在结束阶段，需要有足够的玻璃厚度保证实施低速钻孔，获得流畅的出口^[12]。

最后，将上有腐蚀成型沟道的玻璃底片与另一块玻璃底片进行键合制成完整的微流控芯片。玻璃微流控芯片的键合方式有热键合、阳极键合和间质键合3大类。根据实验室条件，选择热键合对加工好的基片、盖片进行封接。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.